

Studio della fosfolipidosi indotta da farmaci in 'precision cut slices' di fegato di ratto

S. Dragoni, A. Valeri, G. Cruciani, L. Goracci, M. Valoti

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena e Dipartimento di Chimica, Biochimica e Biotecnologie, Università di Perugia

Alcuni farmaci sono in grado di promuovere fosfolipidosi (PLD) ovvero un eccessivo accumulo di fosfolipidi nel citoplasma, causato da un alterato catabolismo lisosomiale dei fosfolipidi stessi. I farmaci che inducono PLD non appartengono ad una precisa classe terapeutica ma presentano caratteristiche strutturali simili: sono molecole amfifiliche di tipo cationico (Cationic Amphiphilic Drugs, CADs) che generalmente presentano un gruppo aminico caricato positivamente, e una parte idrofoba costituita da un anello aromatico o alifatico. Sono queste due entità strutturali che conferiscono l'amfifilicità responsabile del comportamento lisosomotropico. PLD è stata associata a differenti patologie, anche gravi quali: fibrosi alveolare ed epatica (amiodarone), tossicità sul tubulo renale (gentamicina), e prolungamento dell'intervallo QT, attraverso l'inibizione secondaria dei canali hERG nel cuore (tamossifene) (Quiroz et al., 2011).

A conferma della crescente attenzione verso il tema, va riportato che la FDA, già nel 2004, ha istituito un 'PLD working group', che si occupava di sviluppare modelli sensibili e specifici per studiare l'induzione di PLD durante lo sviluppo preclinico di farmaci.

In linea con quanto riportato lo scopo della nostra ricerca è stato quello di mettere a punto un modello *in vitro* di PLD utilizzando fettine ('precision cut slices') di fegato di ratto. Le fettine erano incubate in medium RPMI per tempi diversi (0-24h) in presenza di farmaci induttori di PLD, quali amiodarone ed imipramina. Alla fine dell'incubazione l'enzima esosaminidasi (EC 3.2.1.52; HEX), marker di danno lisosomiale, era dosato sia nel medium che nell'omogenato delle fettine. Attraverso analisi HPLC-MS è stata misurata la concentrazione di farmaco nelle fettine ed è stato possibile caratterizzarne i principali metaboliti.

Il rilascio di HEX dalle fettine era tempo-dipendente e aumentava in funzione del tempo di incubazione. In presenza di amiodarone o imipramina il rilascio di HEX dalle fettine era maggiore del 30% rispetto al valore osservato in condizioni di controllo. Tuttavia anche in presenza di un cimetidina, farmaco che non promuove PLD, si aveva un aumento di circa il 20% del rilascio di HEX. In una seconda serie di esperimenti è stato dosato il rilascio di un altro enzima lisosomiale la fosfatasi acida. In questo caso non si osservano differenze nel rilascio dell'enzima tra le fettine mantenute in condizioni di controllo e quelle incubate in presenza di CADs.

L'analisi HPLC-MS dimostrava che l'"uptake" dei farmaci da parte del tessuto era relativamente veloce ed il massimo si raggiungeva già nella prima ora di incubazione. Inoltre i principali metaboliti di fase I e di fase II sono stati identificati sia nel medium di incubazione che nell'omogenato delle fettine.

I risultati preliminari ottenuti consentono di concludere che le 'precision cut-slices' di fegato rappresentano un efficiente modello per lo studio delle cinetiche e del metabolismo di uno xenobiotico. Ulteriori esperimenti tuttavia, dovranno essere condotti per la validazione del modello in studi 'screening' di induzione di fosfolipidosi da parte di farmaci.

Il presente lavoro è stato finanziato da MIUR nell'ambito dei progetti 'FIRB-Futuro in Ricerca 2010', progetto RBF10X500.

Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Toxicol Sci. 2011; 119: 245-56.